

## ピラジナマイド耐性結核菌の検査について

## 第1報 従来使用されている培地による検査と

## pH 5.5 の培地による基礎実験

沢 井 武

北里研究所附属病院 (指導 小川辰次)

受付 昭和34年1月9日

## I 緒 言

ピラジナマイド (以下 PZA と略) 耐性結核菌の検査に適当な培地を考案する目的で種々の実験を試みた。

## II 実験方法および実験成績

A) 従来使用されている 3% 小川培地, 1% 小川培地, Sauton 培地による実験

従来使用されている培地では PZA の結核菌の発育を阻止する力は弱く表現され, したがって耐性の出現の限界がはつきりしないと称されている。そのようなことがあるかどうかと思い 2~3 の培地について実験した。

## 1) 3% 小川培地による直接法

3% 小川培地とは, われわれが喀痰または胃液その他の材料から 4% NaOH で処理したものを 0.1 cc 接種して結核菌を分離するのに用いている培地である。耐性検査用培地を作る目的で, 平沢<sup>9)</sup>らが SM, PAS 等で実施した流しこみの方法に準じて, 3% 小川培地に PZA を流しこんだらどうかと思つて, PZA の培地内濃度が 1,000  $\gamma$  になるようにするため, 50 mg/cc の溶液を作ろうとしたところ溶解せず, 加熱してやつと溶解させても温度が下るとすぐ PZA の白い結晶を析出するので流しこみによる方法は不可能であることが分つた。

それで原液に PZA を混入し溶解させる方法を行つた。PZA の培地内濃度を 5,000  $\gamma$  とするように原液に 15,000  $\gamma$  の割合に PZA を入れ軽く加温すると完全に溶解した。これを原液で希釈し 5 段階あるいは 9 段階の原液を作り, そのまた 1 つの原液は対照として PZA の混入しないものを作り, それぞれに型のごとくマラカイト緑, グリセリンと全卵液を加え 5 cc 宛中試験管に分注さらに凝固し表 1 のように培地 1 cc について 5,000  $\gamma$ , 1,000  $\gamma$ , 200  $\gamma$ , 40  $\gamma$ , 0  $\gamma$ , あるいは表 2 のように 9 段階の混入濃度の耐性検査用培地を作つた。材料は本院入院中の患者で PZA を使用したことのないもの 4 人の喀痰を選んだ。検査の前日に投薬

を中止したことはもちろんである。早朝の喀痰を滅菌遠沈管にとり塗抹検査をしたのち, 8% NaOH を喀痰と等量加えよく均等化してその 0.1 cc 宛を 1 組の耐性検査用培地に流注した。判定期間は 4~5 週とした。

表 1 3% 小川培地を用いた直接法  
[その1] 2~3 の例

患者名 ガフキー 番号 PZA 濃度 $\gamma$ /cc	患者名			
	VI	V	II	(-)
5,000	■	■	-	-
1,000	■	■	34	9
200	■	■	92	34
40	■	■	■	62
0	■	■	■	94

注: 表中数字は集落数を示す。その表示は下記のごとし

■……培地全面に発育したもの  
 ■……培地面の約 1/2 に発育したもの  
 ■……培地面の約 1/4 に発育したもの  
 数字……集落数  
 -……発育しなかつたもの

成績は表 1 にみるように菌数の多いものでは 5,000  $\gamma$  の耐性値を示したし菌数の少ないものでも 1,000  $\gamma$  の耐性値を示した。以上の成績から 3% 小川培地における PZA の結核菌の発育阻止力はきわめて弱いことが分る。

次にこれをさらにたしかめるために同様の方法で, 本院入院中の患者で PZA 未使用のもの 18 例, PZA 使用中または使用後のもの 17 例の耐性検査を行つた。PZA の使用量は 60 g から 360 g の間で 4 週目の完全耐性値をとつた。成績は表 2 の合計の項でみるようであつて, 1,000  $\gamma$  以上に耐性を示すものが PZA 未使用例 18 例中 9 例, PZA 使用例 17 例中 14 例あつた。

すなわち 3% 小川培地では PZA は感性菌に対する阻止力が非常に弱く PZA 使用例と未使用例の間に耐性値の差がない。次に接種菌量と耐性値との関係を検討するために対照培地に発育した集落数を ■, ■, ■, ■, ■

表 2 3% 小川培地を用いた直接法

〔その2〕 PZA 使用および未使用患者の PZA 耐性値と接種菌量による差異

PZA使用の有無	未 使 用 例										使 用 例										
	PZA濃度 $\gamma/cc$										PZA濃度 $\gamma/cc$										
集落数	0	20	40	100	200	400	1,000	2,500	5,000	計	0	20	40	100	200	400	1,000	2,500	5,000	計	
卅	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
卅	0	0	0	1	0	0	2	1	2	6	0	0	0	0	0	1	3	2	1	7	7
卅	0	0	1	3	0	0	3	0	0	7	0	0	0	1	0	0	4	1	0	6	6
+	0	0	0	2	1	1	0	0	0	4	0	0	0	1	0	0	3	0	0	4	4
合計	0	0	1	6	1	1	6	1	2	18	0	0	0	2	0	1	10	3	1	17	17

注：表中数字は例数を示す

に分けて検討した。すなわち表に示すように未使用例、使用例ともに菌量が多くなるといって耐性値が高くなる傾向にあるが、菌量が少なくても耐性値の高くできるものがある。

以上 3% 小川培地による実験を小括すると、3% 小川培地における PZA の耐性値を PZA 未使用の患者の喀痰を用いて調べると、菌量の多いものでは 5,000  $\gamma$  の耐性を示すものもあるし、菌量の少ないものでも 1,000  $\gamma$  の耐性を示すものもある。また PZA の未使用、使用には無関係に耐性値は種々に分散している。これらの成績より接種後の培地 pH 6.9 前後の 3% 小川培地は PZA 耐性測定用培地としては不適當であるといえる。

2) 1% 小川培地による間接法

PZA の濃度を培地 1 cc について 5,000  $\gamma$ 、1,000  $\gamma$ 、100  $\gamma$ 、10  $\gamma$ 、0  $\gamma$  のような 5 段階に混入された 1 組の 1% 小川培地を作った。薬剤の混入方法は前述の 3% 小川培地の場合と同様である。

表 3 間 接 法

〔その1〕 1% 小川培地による成績

PZA 濃度 $\gamma/cc$	菌 量	菌 量		
		$10^{-3}mg$	$10^{-4}mg$	$10^{-5}mg$
5,000	卅		51	—
1,000	卅	卅		15
100	卅	卅		31
10	卅	卅		30
0	卅	卅		49

注：表 1 に同じ

この 1 組の培地に 1% 小川培地に 2 週間培養した H<sub>37</sub>Rv 株で菌液を作り、 $10^{-3}mg$ 、 $10^{-4}mg$ 、 $10^{-5}mg$  をそれぞれ 0.1 cc に含ませて培養した。4 週目の成績は表 3 に示すように  $10^{-3}mg$ 、 $10^{-4}mg$  では、5,000  $\gamma$  の耐性を示し、集落算定のできる  $10^{-5}mg$  でも 1,000  $\gamma$  の耐性を示している。以上より pH 6.9 の

1% 小川培地においても PZA の発育阻止力はきわめて弱く PZA 耐性測定用培地としては不適當である。

3) Sauton 培地による間接法

Sauton 培地は培地としては発育のよくない培地である。発育の悪い培地はどうかと思つて本培地を使用してみた。PZA を Sauton 培地に混入し軽く加温して溶解させた。薬剤混入濃度は培地 1 cc について 5,000  $\gamma$ 、1,000  $\gamma$ 、100  $\gamma$ 、10  $\gamma$ 、0  $\gamma$  の 5 段階である。これらはいずれも 5 cc 宛中試験管に分注されている。接種した菌種は H<sub>37</sub>Rv 株の感性株と H<sub>37</sub>Rv 株の INH 10  $\gamma$  耐性株、PAS 10  $\gamma$  耐性株、SM 10  $\gamma$  耐性株と黒野株を用いた。各菌株をひとまず Sauton 培地の表面に培養し、培地表面に発育した菌膜を 1 白金耳とつて接種した。判定は 1 カ月後行つた。

表 4 間 接 法

〔その2〕 Sauton 培地による成績

PZA 濃度 $\gamma/cc$	菌 株	H <sub>37</sub> Rv 株				黒野株
		感性	INH 耐性	PAS 耐性	SM 耐性	
5,000	卅	+	—	—	卅	
1,000	卅	+	±	+	卅	
100	卅	+	±	+	卅	
10	卅	卅	±	±	卅	
0	卅	卅	卅	卅	卅	

注：表中の記載は菌発育の状態を示す。その表示は下記のごとし

- 卅……全面発育
- 卅……培地面の約 2/3 に発育
- 卅……培地面の約 1/3 に発育
- ±……培地面の 1/3 以下に発育
- ±……かすかな発育を認めたもの

成績は表 4 のようであつて H<sub>37</sub>Rv 株および黒野株は 5,000  $\gamma$  の耐性を示した。次に耐性菌は感性菌に比していずれも発育はよくないがしかし INH 耐性株はやはり 5,000  $\gamma$  に耐性を示し、PAS 耐性株および SM 耐性株は 1,000  $\gamma$  に耐性を示した。以上の成績が

1959年7月

ら pH 7.2 の Sauton 培地においては PZA の阻止力はきわめて弱くこの培地も PZA 耐性測定用培地としては不適當である。

B) pH を 5.5 にした培地による実験

耐性検査を行うには菌の発育の優れた培地を用いるのが理想であるが、前述のように従来使用されている 3% 小川培地、1% 小川培地、Sauton 培地は PZA 耐性測定用には不適當であつたのでやむをえず改善の策として McDermott らがいつているように培地 pH の酸性のところまで試みてはどうかと考え次のような実験を行つた。

a) 培地 pH の結核菌の発育に対する影響

まず pH が酸性になると菌の発育がどの程度障害されるかを 2~3 の培地を用いて実験した。

1) Kirchner 培地による実験

Kirchner の基汁に 8% HCl および 4% NaOH を加えて種々の pH に補正しこれに 10% の割合に馬血清を加えて pH 5.48 から 8.14 まで 7 種類の培地を作つた。pH の測定は硝子電極によつた。

表 5 結核菌の発育に対する pH の影響  
[その1] Kirchner 培地による成績

pH	5.48	5.93	6.24	6.87	7.46	7.92	8.14
10 <sup>-1</sup> mg	-	■	■	■	■	■	■
10 <sup>-2</sup> mg	-	■	■	■	■	■	■
10 <sup>-3</sup> mg	-	■	■	■	■	■	■
10 <sup>-4</sup> mg	-	+	+	+	+	+	±
10 <sup>-5</sup> mg	-	+	+	+	+	-	-

注：表中の記号は菌の発育の状態を示す。その表示は下記のごとし  
 ■……菌膜が試験管の管壁まではい上つたもの  
 ■……培地表面の全体に菌膜の垢がつたもの  
 ■……培地表面の 1/2 に菌膜の垢がつたもの  
 ■……培地表面に少量発育したもの  
 +……試験管の底に発育したもの  
 ±……かすかな発育を認めたもの

これらの pH の異なる 1 列の培地に 1% 小川培地に 4 週間培養した H<sub>37</sub>Rv 株を 10<sup>-1</sup>mg から 10<sup>-5</sup>mg までを 0.1 cc に含ませて 2 本宛接種し、37° C で 4 週間培養した。成績は表 5 のようであつて、pH 6.87, 7.46 のところがもつとも発育がよく、それより酸性およびアルカリ性に傾くに従つて発育が悪くなり、pH 5.48 のところでは 10<sup>-1</sup>mg の大量の菌の培養でも発育しない。

2) 1% 小川培地による実験

1% 小川培地の原液に 8% HCl および 4% NaOH を加えて種々の pH とし、その後卵液を加えて 5cc 宛中試験管に分注凝固し pH の異なる 6 種類の培地を作つた。培地の pH は培地に約 10 cc の蒸留水を加え割箸でよく培地を潰しそれを濾紙で濾過した液につき硝子電極で測定した。pH は 5.14, 5.51, 5.67, 6.95, 7.39,

8.14 の 6 種類である。これら 1 系列の培地に 1% 小川培地に 3 週間培養した H<sub>37</sub>Rv 株で菌液を作り 10<sup>-1</sup>mg から 10<sup>-5</sup>mg までを 0.1 cc に含ませて 3 本宛接種し 4 週で判定した。

表 6 結核菌の発育に対する pH の影響  
[その2] 1% 小川培地による成績

pH	5.14	5.51	5.67	6.95	7.39	8.14
10 <sup>-1</sup> mg	-	■	■	■	■	-
10 <sup>-2</sup> mg	-	■	■	■	■	-
10 <sup>-3</sup> mg	-	160	■	■	46	-
10 <sup>-4</sup> mg	-	32	74	91	11	-
10 <sup>-5</sup> mg	-	7	18	16	-	-

注：表 1 に同じ

成績は表 6 のようであつて pH 5.67 と pH を修正しない本来の 1% 小川培地の pH 6.95 のところでもつとも菌の発育がよく、それより酸性側、アルカリ側に傾くにつれて発育が悪くなり pH 5.14 と pH 8.14 のところでは菌は発育しない。すなわち液体培地でも固形培地でも中性付近がもつとも発育がよく、それよりも酸性側、アルカリ側に傾くにつれて発育が悪くなることが分つた。このことは従来の成績と全く一致する。

b) 培地 pH の PZA 耐性値に及ぼす影響

Kirchner 液体培地では pH 5.5 のところでは結核菌は発育しなかつたが、1% 小川培地では結核菌が発育している。それに耐性検査に使用する培地とすればやはり固形培地が適當である。それで 1% 小川培地を使用した。まず 1% 小川培地の原液を作りこれを 6 つのコルベンに分け、1 つはそのままとし他の 3 つに原液 100 cc に対して 8% HCl 18 cc, 14 cc, 10 cc をそれぞれ加え、残りの 2 つに原液 100 cc に対して 8% NaOH 1.2 cc, 3.4 cc をそれぞれ加えた。これらより修正に加えた HCl, NaOH の量を差引いて 100 cc 宛 6 種類の pH の原液にそれぞれ PZA の培地混入濃度が 5,000 γ, 1,000 γ, 200 γ, 40 γ となるよう 15,000 γ/cc, 3,000 γ/cc, 600 γ/cc, 120 γ/cc の割合に混入し軽く加温して溶解させ、対照として薬剤の入らない原液を用意し、型のごとく全卵液、マラカイト緑、グリセリンを加え、5 cc 宛分注、凝固器で凝固した。すなわち pH が 6 種類でその 1 つについて薬剤濃度が 5 段階ある培地ができたわけである。このようにしてできた培地の対照を前同様にして pH を測定すると表 7 のように 5.14, 5.51, 5.67, 6.95, 7.39, 8.14 となつた。

1% 小川培地に 4 週間培養した H<sub>37</sub>Rv 株を手振り法で菌液とし 10<sup>-1</sup>mg から 10<sup>-5</sup>mg までを 0.1 cc に含ませて、pH の異なる 6 種類の耐性測定用の培

表7 pHとPZA耐性値との関係

PZA 濃度 γ/cc	菌量 pH	10 <sup>-1</sup> mg						10 <sup>-2</sup> mg						10 <sup>-3</sup> mg					
		5.14	5.51	5.67	6.95	7.39	8.14	5.14	5.51	5.67	6.95	7.39	8.14	5.14	5.51	5.67	6.95	7.39	8.14
5,000		-	-	-	■	■	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	■	-	-
1,000		-	-	+	■	■	-	-	-	-	■	■	-	-	-	-	■	+	-
200		-	-	■	■	■	-	-	-	+	■	■	-	-	-	-	9	■	+
40		-	16	■	■	■	-	-	7	■	■	■	-	-	-	-	+	■	+
0		-	■	■	■	■	-	-	■	■	■	■	-	-	180	+	■	+	-

PZA 濃度 γ/cc	菌量 pH	10 <sup>-4</sup> mg						10 <sup>-5</sup> mg					
		5.14	5.51	5.67	6.95	7.39	8.14	5.14	5.51	5.67	6.95	7.39	8.14
5,000		-	-	-	101	-	-	-	-	-	11	-	-
1,000		-	-	-	116	47	-	-	-	-	14	10	-
200		-	-	6	120	69	-	-	-	-	25	8	-
40		-	-	41	104	70	-	-	-	8	16	15	-
0		-	40	50	113	91	-	-	6	8	21	16	-

注：表1に同じ

地に接種した。5週目の成績は表7のようであつて、接種菌量のいかんにかかわらず修正しない pH 6.95 のところが耐性値がもつとも高く、それより酸性に傾くとともに耐性値は低くなり、pH 5.51 のところでは接種菌量が 10<sup>-3</sup>mg 以下になると 40 γ 以下の耐性を示している。またアルカリ側に傾いても耐性値は低くであるが pH 8.14 のところでは菌が発育していないので分らない。この傾向は菌の発育の度とはつきりした関係を示し、菌の発育のよいところは耐性値が高く、菌の発育の悪いところは低い耐性値を示している。

III 考 案

われわれは PZA 耐性菌の適正な検査方法を見出すために種々の実験を試みた。耐性検査には発育のよい培地を用いて感性菌と耐性菌を明瞭に区別できるものが望ましい。しかし pH が中性付近でよい発育を示す 3% 小川培地、1% 小川培地、Kirchner 培地、Sauton 培地ではともに PZA の耐性値は高い。このことは諸先進<sup>1)~4)</sup>の成績と一致する。したがつてこれらの培地は PZA 耐性測定用培地としては使用に耐えない。そこで McDermott ら<sup>5)</sup>に従い pH 5.5 の培地について実験をすすめた。H<sub>37</sub>Rv 株を用いて実験すると、Kirchner 培地では pH 5.5 にすると菌は発育しなかつたのに反して、pH 5.5 の 1% 小川培地では本来の pH のところに比して 1/5 ~ 1/4 に集落数が減少するが耐性値は低い。この成績は諸先進<sup>6)~11)</sup>の成績とほぼ一致する。したがつて pH を 5.5 にした 1% 小川培地が PZA の耐性検査には使用できるかも知れないので今後この方向に向つて研究をすすめたいと思つている。

IV 結 論

1) 4% NaOH を 0.1 cc 接種してほぼ中性を示す 3% 小川培地で耐性検査をすると、PZA 使用と未使用とにかかわらず耐性値にほとんど差がなく、しかもがいて耐性値が高い。また PZA 未使用のものでも耐性値の分布は広い。したがつて耐性検査には使用できない。

2) pH のほぼ中性を示す 1% 小川培地および Sauton 培地を用いて保存菌株により耐性を検査すると、いずれも高い耐性を示す。したがつてこれらの培地も PZA 耐性の検査には使用できない。

3) pH 5.5 の Kirchner 培地では H<sub>37</sub>Rv 株の実験で菌は発育しないが、pH 5.5 の 1% 小川培地は H<sub>37</sub>Rv 株を用いて実験すると本来の pH の 6.95 の培地に比して集落数は 1/5 ~ 1/4 に減少するが耐性値は低い。それで PZA 耐性検査用培地としては有望である。

終りに臨み御指導、御校閲を賜つた慶応大学医学部石田教授ならびに小川部長に感謝致します。

本研究には文部省科学研究費「結核化学療法の治療機転の研究」班より研究費の補助を受けた。班代表堂野前教授に感謝致します。(小川辰次)

文 献

- 1) 杉谷：千葉医学会雑誌，33：425，昭32.
- 2) 神頭：胸部疾患，1：198，昭32.
- 3) Maurice & Tarshis：Am. Rev. Tbc.，67：391，1953.
- 4) 高橋・綿引：呼吸器診療，11：59，昭31.
- 5) Walsh McDermott & Ralph Tompsett：Am. Rev. Tbc.，70：748，1954.

- 6) Wasz-Höckert, O., McCune, R. M., & McDermott : Am. Rev. Tbc. 74 : 572, 1956.
- 7) 小川・斎藤・沢井 : 臨床病理, 4 : 304, 昭31.
- 8) 小川 : 北里メディカルニュース, 38 : 11, 昭32.
- 9) 平沢 : 結核, 30 : 199, 昭30.
- 10) 坂本 : Chemotherapy, 4 : 166, 1956.
- 11) 岡野正光・旗野脩一・村尾誠・百瀬達也・永見省・白石透・横山栄二 : 結核研究の進歩, -22 : 47, 昭33.